

**EFEK POLIMORFISME GENA NITRIT OKSIDA SINTASE3(NOS3)
TERHADAP KADAR NITRIT OKSIDA DAN TEKANAN DARAH PADA
INDIVIDU TERPAPAR PLUMBUM**

*(The Effect of Polymorphisms Gene Nitric Oxide Synthase3 (NOS3) on Nitric Oxide
Level and Blood Pressure on Lead-Exposed Individual)*

Hernayanti*, Sukarti Moeljopawiro, Ahmad Hamim Sadewa***,
Bambang Hariono****, Subagus Wahyuono *******

*Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

**Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

***Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

****Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*****Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima: 21 Mei 2012

Disetujui: 3 Juli 2012

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi efek polimorfisme gena nitrit oksida sintase3 terhadap kadar nitrit oksida (NO) dan tekanan darah pada individu terpapar Plumbum. Metode penelitian menggunakan metode survai dengan rancangan kasus kontrol. Subjek kasus terdiri dari 30 orang pekerja bengkel mobil dan 30 orang subjek kontrol berasal dari pedesaan yang mewakili area yang tidak terpolusi Pb. Genotip individu ditentukan dengan metode PCR-RFLP. Parameter yang diukur adalah kadar NO, tekanan darah sistolik dan diastolik serta kadar Pb. Data dianalisis menggunakan uji t independent.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 40% dari subjek kasus, terdeteksi sebagai individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dengan genotip GA, sedangkan 60% dari subjek kasus dan subjek kontrol terdeteksi sebagai individu nonpolimorfisme gena NOS3 dengan genotip GG. Hasil uji t menunjukkan untuk parameter NO, tekanan sistolik, diastole serta Pb menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dengan individu nonpolimorfisme. Kadar NO individu pembawa polimorfisme NOS3 lebih rendah dibandingkan individu nonpolimorfisme. Sebaliknya kadar Pb, tekanan sistolik dan diastole individu pembawa polimorfisme gena NOS3 lebih tinggi dibandingkan individu nonpolimorfisme. Kesimpulan yang diperoleh adalah adanya polimorfisme gena NOS3 dan paparan Pb menyebabkan ketersediaan NO makin rendah dan meningkatkan kadar Pb, tekanan sistolik dan diastolik. Individu terpapar Pb pembawa polimorfisme gena NOS3 beresiko mengalami penyakit hipertensi yang lebih parah dibandingkan individu nonpolimorfisme terpapar Pb.

Kata kunci: Plumbum, Polimorfisme gena NOS3, nitrit oksida, hipertensi

Abstract

*The objective of these study were to know the effect of polymorphisms gene NOS3 on nitric oxide level and blood pressure on lead-exposed individual. The research used survey method and case control design. These cases of subject were 30 autorepair workers and 30 subject control from village (non polluted area). The genotype of individu investigated by **Polimerase Chain Reaction (PCR)- Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)**. The main parameters were nitric oxide (NO), blood pressure systole, dyastole and blood lead level. The data were analyzed by t test independent.*

These result showed that 40 % of cases subject were detected as individual polymorphism of gene NOS3 with GA genotype. In contrast 60 % of cases subject and control subject were detected as non individual polymorphism with GG genotype. Result t test for three parameters i.e. NO, systole, diastole blood pressure and lead showed highly significant difference ($p=0$) between individual polymorphism and non polymorphism. It could be concluded that polymorphism of gene NOS3 on lead-exposed individual influence bioability of NO, systole and diastole. Blood lead level, systole and diastole of individual polymorphism are higher than individual non polymorphism. The risk of hypertension are more seriously on polymorphisms lead-exposure individual than non polymorphisms

Keywords: Blood lead, polymorphisms gene NOS3, nitric oxide, hypertension

PENDAHULUAN

Plumbum (Pb) atau timbal merupakan logam tertua yang telah digunakan manusia sejak 2.500 tahun sebelum Masehi, untuk bahan pembuatan cat, plastik, pestisida, mainan anak, lipstik, dan lainnya. Pb juga digunakan sebagai bahan aditif pada bensin dalam bentuk *tetra ethyl lead* (TEL) dan *tetra methyl lead* (TML). Masalah pencemaran Pb merupakan masalah yang serius baik di negara maju maupun di negara berkembang. Pencemaran Pb terbesar berasal dari udara yaitu sekitar 70%, karena pemakaian bensin bertimbal seperti TEL. Pencemaran Pb terutama terjadi di beberapa kota di Indonesia seperti Jakarta, Surabaya, Bandung dan Jogjakarta. Hal ini seiring dengan bertambahnya jumlah kendaraan bermotor yang setiap tahunnya meningkat bahkan lebih dari 20 juta unit per tahun. Peningkatan kadar Pb di beberapa kota besar rata-rata mencapai 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per tahun atau telah melewati nilai ambang batas Pb di udara yaitu sebesar 0,006 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. (Saruji, 1995, Widowati dkk., 2008).

Senyawa Pb dalam bentuk organik terutama TEL, merupakan senyawa toksik yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia. Senyawa ini mudah masuk lewat inhalasi, larut dalam lemak dan mudah terakumulasi dalam jaringan lunak maupun keras. (Gustavsoon *et al.*, 2001, Menke *et al.*, 2006., Acien *et al.*, 2007). Sebagai akibatnya, orang yang sehari-hari kontak dengan Pb antara lain polisi lalu lintas, operator pompa bensin, sopir bus, pedagang asongan dan orang yang bekerja pada industri yang menggunakan Pb, beresiko terpapar Pb. Kadar Pb di udara sebesar 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dapat menyebabkan darah manusia mengandung Pb sebesar 0,25-0,53 ppm. Selain itu paparan Pb meskipun dalam kadar rendah (<0,05 ppm) dapat menimbulkan penyakit seperti hipertensi, jantung koroner dan gagal ginjal (Carmignani *et al.*, 1999., Ding *et al.*, 2002, Barbarosa *et al.*, 2005).

Kasus hipertensi akibat paparan Pb di Indonesia dilaporkan sebanyak 62.000 kasus dan 350 kasus berupa penyakit jantung koroner. Jumlah korban jiwa akibat paparan

Pb mencapai 340 jiwa/tahun (Riyadina dkk., 2002). Adanya polimorfisme gena nitrit oksida sintase3 pada individu terpapar Pb akan menyebabkan penyakit hipertensi bertambah parah.

Untuk mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 pada individu terpapar Pb dan mendeteksi lebih dini adanya penyakit hipertensi, maka dilakukan penelitian ini.

TINJAUAN PUSTAKA

Senyawa Pb merupakan senyawa yang bersifat toksik, karena mudah berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) penyusun enzim. Salah satu efek paparan Pb pada manusia dalam jangka lama adalah menyebabkan terjadinya penyakit hipertensi. Senyawa Pb terutama dalam bentuk Pb trietil merupakan senyawa radikal yang dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas seperti hidroksil dan anion superoksida pada endotel. Hal ini akan menyebabkan hambatan terhadap aktivitas enzim nitrit oksida sintase pada endotel (eNOS). Enzim eNOS diekspresikan oleh gena NOS3 (nitrit oksida sintase3). Enzim ini berfungsi untuk menghasilkan nitrit oksida (NO) yang berperan dalam vasodilatasi pembuluh darah vaskuler. Adanya hambatan eNOS oleh Pb mengakibatkan produksi NO menurun dan peningkatan aktivitas Angiotensin II vaskuler.

Angiotensin II berperan dalam vasokonstriksi dan bersama NO yang berperan sebagai vasodilator, mengatur keseimbangan tekanan darah pada otot vaskuler. Peningkatan aktivitas Ang II dan penurunan aktivitas NO, menyebabkan terjadinya vasokonstriksi yang terus menerus, sehingga tekanan darah meningkat dan menyebabkan penyakit hipertensi. Penderita hipertensi akibat paparan Pb keadaannya makin parah apabila membawa polimorfisme gena NOS3. Individu pembawa polimorfisme gena NOS3, G894T menunjukkan penurunan ekspresi eNOS sehingga produksi NO makin sedikit, sehingga tekanan darah semakin meningkat (Hingorani *et al.*, 1999, Afrasyap *et al.*, 2004, Howard *et al.*, 2005).

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan metode survei dengan rancangan penelitian kasus kontrol. Subjek kasus penelitian adalah pekerja bengkel mobil di Purwokerto yang mewakili kelompok individu terpapar Pb yang memenuhi kriteria inklusi : pekerja bengkel dengan masa kerja minimal 3 tahun berusia antara 30-55 tahun dan bersedia menandatangani *Informed Consent*. Jumlah responden sebanyak 30 orang. Sebagai subjek kontrol adalah 30 orang responden bukan pekerja bengkel yang memenuhi kriteria inklusi: laki-laki berusia 30-55 tahun. Berasal dari daerah pedesaan yang tidak terpolusi Pb, memiliki kadar kolesterol, Indeks massa tubuh dan gula darah normal. Lokasi penelitian di bengkel yang ada di wilayah Purwokerto, dan desa Pamijen untuk area yang tidak terpolusi.

Materi

Materi penelitian berupa sampel darah responden pekerja bengkel.

Darah EDTA sebanyak 3 cc, digunakan untuk isolasi DNA.

Darah sebanyak 7 cc digunakan untuk pemeriksaan Pb, dan NO.

Bahan

Bahan yang digunakan untuk analisis adalah sebagai berikut:

PCR-RFLP.

Primer NOS3, primer ALAD, guanidin, TE buffer, NaCl 4 M, agarosa gel 2%, enzim MboI (NOS3), Enzim MspI (ALAD), pewarna etidium bromid.

Nitrit oksida.

Kit NO Biorad.

Alat

Tensimeter digital, seperangkat alat PCR, Elisa Reader, Spektrofotometer.

CARA KERJA

Pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme G894T gena NOS3.

Amplifikasi gena dengan PCR (Hingorani *et al.*, 1999).

Primer forward : 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3' dan primer reverse: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3', menghasilkan produk sepanjang 206 bp. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 94°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94°C 1 menit, annealing 60°C 1 menit, elongasi 72°C 1 menit dan elongasi akhir 72°C 7 menit. Pemotongan PCR product dengan enzim endonuklease *MboI*. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dan divisualisasikan dengan etidium bromide dibawah sinar UV. Hasil elektroforesis adalah: GG tidak terpotong, TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, GA menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp.

Pemeriksaan Pb dengan alat AAS.

Pemeriksaan NO dengan metode ELISA.

Pemeriksaan tekanan darah dengan alat tensimeter digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Polimorfisme gena Nitrit Oksida Sintase3(NOS3)

Polimorfisme gena NOS3 dari 30 orang pada subjek kasus ditemukan sebanyak 12 orang, atau sekitar 40% individu merupakan pembawa polimorfisme gena NOS3 dengan genotip GA. Produk DNA terpotong pada 206 bp, 119 bp dan 87 bp (Gambar 1), sedangkan sebanyak 60 % pada subjek kasus tidak membawa polimorfisme gena NOS3, dengan genotip GG terdapat pada 206 bp (Gambar 2). Pada subjek kontrol juga tidak ditemukan polimorfisme gena NOS3. Produk DNA tidak terpotong dan terletak pada 206 bp (Gambar 3).

Kadar Plumbum (Pb) darah

Pada individu pembawa polimorfisme gena NOS3 juga terdapat perbedaan kadar Pb. Pada individu dengan polimorfisme ditemukan kadar Pb lebih tinggi dibandingkan individu nonpolimorfisme yaitu rata-rata sebesar 0,65 ppm, sedangkan pada individu nonpolimorfisme atau tidak membawa gen polimorfisme NOS3 memiliki kadar Pb rata-rata sebesar 0,49 ppm. Subjek kontrol memiliki kadar Pb rata-rata 0,15 ppm (Gambar 3). Hasil uji t juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata kadar Pb antara

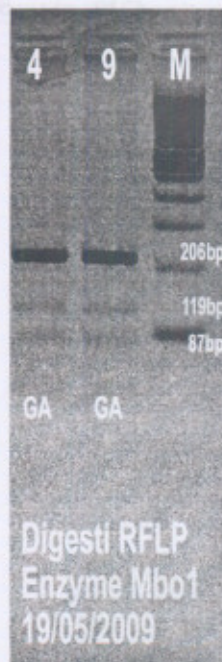
individu polimorfisme dengan nonpolimorfisme ($p=0$), dapat dilihat pada Tabel 1.

Menurut Napoli dan Ignaro (2006) adanya pembawa polimorfisme gen NOS3 menyebabkan ekspresi eNOS berkurang, sedangkan radikal Pb yang masuk tubuh menghambat kerja enzim eNOS (Acien *et al.*, 2007). Hal ini yang menyebabkan individu polimorfisme NOS3 lebih rentan terhadap paparan Pb dibandingkan individu nonpolimorfisme, sehingga memiliki kadar Pb lebih tinggi.

Kadar nitrit oksida (NO)

Kadar NO rata-rata pada individu pembawa polimorfisme gen NOS3 adalah sebesar $7.8 \mu\text{mol/L}$, sedangkan pada individu nonpolimorfisme sebesar $11.6 \mu\text{mol/L}$. Kadar NO keduanya lebih rendah dibandingkan dengan kadar NO pada subjek kontrol yaitu sebesar $18.5 \mu\text{mol/L}$ (Gambar 4).

Hal ini sesuai dengan pendapat Howard, *et al.*, (2005) dan Yoshi *et al.*, (2007) yang menyatakan bahwa adanya polimorfisme gen NOS3 yaitu gen pengatur eNOS menyebabkan ekspresi eNOS menurun, sehingga produksi NO yang dihasilkan juga sedikit. Adanya radikal Pb yang berasal dari lingkungan yang masuk ke dalam tubuh pekerja bengkel, menyebabkan gangguan pada aktivitas enzim eNOS, sehingga NO yang dihasilkan juga semakin rendah. Akibat yang ditimbulkan adalah kadar NO pada individu pembawa polimorfisme gen NOS3 yang terpapar Pb sangat rendah, atau lebih rendah dibandingkan dengan individu terpapar Pb nonpolimorfisme. Hasil analisis statistik kadar NO menggunakan uji t pada individu pembawa polimorfisme dan individu nonpolimorfisme terpapar Pb, juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p=0$), dapat dilihat pada Tabel 2.

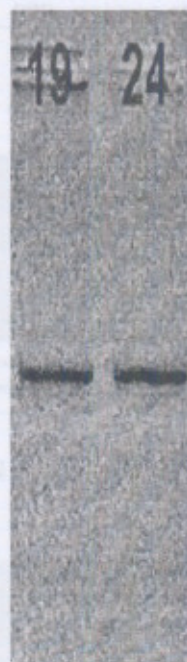


Gambar 1.

Hasil analisis gen yang mengkode Enos pada subjek kasus

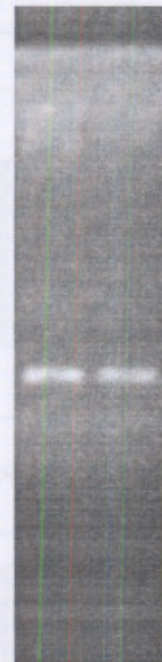
Keterangan: GA = mutasi heterozigot (polimorfisme)

M = Marker



Gambar 2

Hasil analisis gen yang mengkode eNOS subjek kasus Jenis genotip GG (tidak ada polimorfisme /non polimorfisme)



Gambar 3

Hasil analisis gen yang mengkode eNOS subjek kontrol Jenis genotip GG (tidak ada polimorfisme/non polimorfisme)

Tekanan sistolik dan diastolik

Adanya polimorfisme gena NOS3 pada individu terpapar Pb menyebabkan peningkatan tekanan darah atau menyebabkan hi-

pertensi. Tekanan darah sistolik pada individu polimorfisme rata-rata sebesar 142 mm/Hg, sedangkan pada individu nonpolimorfisme rata-rata sebesar 137 mm/Hg. Tekanan darah

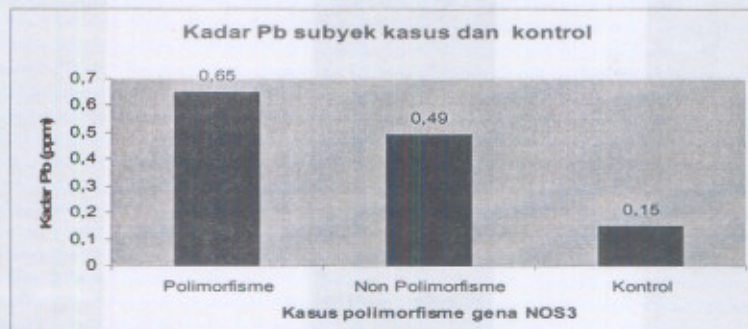
Tabel 1. Hasil analisis uji t Kadar Pb individu polimorfisme dan nonpolimorfisme

One-Sample Statistics

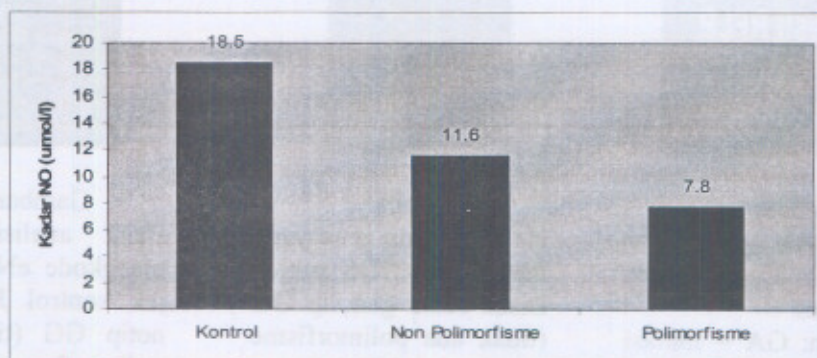
	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error rata-rata
polimorfisme	12	,6492	,09802	,02830
nonpolimorfisme	18	,4933	,13962	,03291

One-Sample Test

Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
polimorfisme	22,942	11	,000	,6492	,5869	,7114
nonpolimorfisme	14,991	17	,000	,4933	,4239	,5628



Gambar 3. Kadar Pb pada subjek kasus dan subjek kontrol

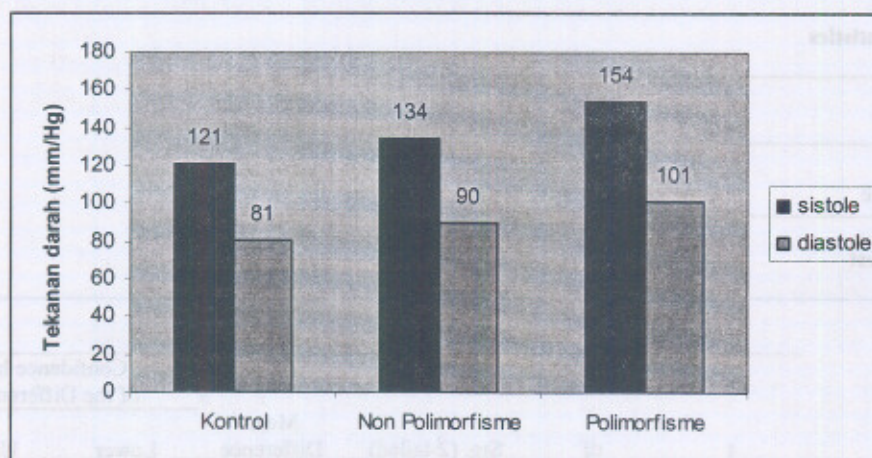


Gambar 4. Kadar NO pada subjek kasus (polimorfisme dan nonpolimorfisme gena NOS3) dibandingkan dengan subjek kontrol

Tabel 2. Hasil analisis uji t kadar NO individu polimorfisme dan non polimorfisme

One-Sample Statistics				
	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error rata-rata
polimorfisme	12	36,33	6,569	1,896
nonpolimorfisme	18	58,61	10,539	2,484

One-Sample Test						
Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
polimorfisme	19,160	11	,000	36,33	32,16	40,51
nonpolimorfisme	23,594	17	,000	58,61	53,37	63,85



Gambar 5. Tekanan darah sistolik dan diastolik subjek kasus polimorfisme gena NOS3 dan subjek kontrol.

One-Sample Statistics				
	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error rata-rata
polimorfisme	12	145,17	6,873	1,984
nonpolimorfisme	18	137,33	9,274	2,186

One-Sample Test						
Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
polimorfisme	73,163	11	,000	145,17	140,80	149,53
nonpolimorfisme	62,829	17	,000	137,33	132,72	141,94

diastolik individu polimorfisme juga lebih tinggi dibandingkan individu nonpolimorfisme yaitu rata-rata sebesar 102 mm/Hg dan individu nonpolimorfisme rata-rata sebesar 99 mm/Hg, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.

Hasil uji t juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara tekanan sistolik dan diastolik pada individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dengan individu nonpolimorfisme ($p = 0$), dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Hasil uji t tekanan darah sistolik pada individu polimorfisme dan nonpolimorfisme.

Adapun jenis hipertensi berdasarkan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dapat dilihat pada Gambar 6.

Jenis hipertensi yang ditemukan dari 30 orang subjek kasus adalah sebanyak 63.7% mengalami pre hipertensi dengan tekanan sistolik antara 120-139 mm/Hg dan yang mengalami hipertensi tingkat 1 sebanyak 37.7%. Mekanisme timbulnya hipertensi, diawali dengan terjadinya peningkatan radikal bebas dalam tubuh oleh Pb, kemudian hambatan Pb terhadap enzim eNOS pada endotel, sehingga produksi NO menurun,

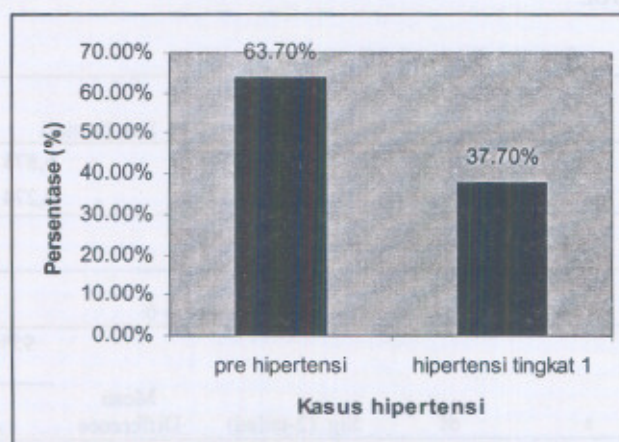
Tabel 4. Hasil analisis uji t tekanan darah diastolik pada individu polimorfisme dan nonpolimorfisme

One-Sample Statistics

	N	Rata-rata	Std. Deviasi	Std. Error rata-rata
polimorfisme	12	102,25	10,358	2,990
nonpolimorfisme	18	97,06	12,288	2,896

One-Sample Test

Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
polimorfisme	34,195	11	,000	102,25	95,67	108,83
nonpolimorfisme	33,510	17	,000	97,06	90,94	103,17



Gambar 6. Jenis hipertensi berdasarkan pengukuran tekanan sistolik dan diastolik pada subjek kasus dan kontrol

sebaliknya produksi peroksid nitrit (ONOO^\cdot), meningkat. Hal ini menyebabkan disfungsi endotel. Selain itu ONOO^\cdot juga menyebabkan degradasi tetrahidrobiopterin (BH_4) yang merupakan kofaktor eNOS, sehingga terjadi penurunan BH_4 dan peningkatan dihidrobiopterin (BH_2) serta produksi NO diperpendek. Akibatnya vasodilatasi yang diperankan NO juga menurun. Selanjutnya terjadi aktivasi angiotensin II endotel sehingga menyebabkan vasokonstriksi yang berlangsung terus menerus. Peristiwa ini menimbulkan peningkatan tekanan darah atau hipertensi. Aktivasi angiotensin II juga menginduksi Nuklear Faktor kappa beta (NFKB), selanjutnya NFKB menginduksi gena proinflamasi. Proses berikutnya adalah terjadinya agregasi trombosit, peningkatan molekul adhesi dan matrik ekstraseluler pada endotel, inflamasi vaskuler, kerapuhan sel endotel sehingga hipertensi bertambah parah dan menyebabkan penyakit atherosclerosis (Panza, 1997., Ding, *et al.*, 2002).

KESIMPULAN

Hasil analisis DNA dari 30 orang individu terpapar Pb (pekerja bengkel) ditemukan adanya polimorfisme gena NOS3 sebesar 40% dan nonpolimorfisme sebanyak 60 %. Pada subjek kontrol tidak ditemukan adanya polimorfisme gena NOS3.

Kadar Pb individu pembawa polimorfisme gena NOS3 lebih tinggi dibandingkan dengan individu nonpolimorfisme dan subjek kontrol.

Kadar NO pada individu pembawa polimorfisme gena NOS3 lebih rendah dibandingkan individu nonpolimorfisme dan subjek kontrol.

Tekanan darah sistolik dan diastolik individu polimorfisme lebih tinggi dibandingkan individu nonpolimorfisme dan subjek kontrol.

Jenis hipertensi yang ditemukan pada subjek kasus adalah pre hipertensi sebanyak 63.7% dan hipertensi tingkat 1 sebanyak 36.7%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mencari cara mengatasi keracunan Pb pada manusia. Peneliti sedang melakukan penelitian cara mengatasi keracunan Pb dengan menggunakan kelator alami yaitu berupa teh hijau.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ditujukan kepada Proyek Hibah Doktor Universitas Gadjah Mada 2009 yang telah memberikan dana untuk penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Acien, A.N.,E., Guallar, E.K., Silbergerd, S.J.,Rotenberg. Lead exposure and cardiovascular disease – A systemic review. *Environ. Health Perspect.* 115 (3): 472-482 (2007)
- Barbosa, F., J.E.T., Santos, R.F., Gerlach., P.J. Parsons A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations and Future Needs. *Environ. Health Perspect.* 113 (12) pp 1669–1674 (2005)
- Carmignani, M. Boscolo., A. Poma .,A.R. Volpe (1999). Kinergic system and arterial hypertension following chronic exposed to inorganic lead. *Immunopharmacology* 44, pp. 105-110
- Ding Y, H C Gonick,V.D.Vaziri. Lead induced hypertension: Increase hydroxyl radical production. *Am.J. Hypertension* 14, pp. 169-173 (2002).
- Gustavsson, P .N. Plato., J.Hallqvist., J. Hogstedt., M.Lewne., C.Reuterwall.A population-based-case referent study of myocardial infarction and occupational exposure to motor exhaust, other combustion product,organic solvents,lead and dynamite. Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP)

- Study group *Epidemiology*. 12, pp 222-228 (2001).
- Hingorani D.A., C.F., Liang, J., Fatibene, A., Lyon, S., Monteith, A., Parsons, S., Haydock, R.V., Hooper, N.G., Stephens, K.M Osaughnessy, M.J. Brown 1999. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu²⁹⁸ → Asp) Is A mayor Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. American Health Association, Inc. *Circulation* 10(5), pp. 1515-1520 (1999).
- Howard T.D., W.H., Giles, J., Xu, M.A., Woznaik, A.M., Malarcher, L.A., Lange, R.F., Macko, M.J., Basehore, D.A., Meyers, J.W., Cole, S.J., Kittner. Promoters polymorphisms in the nitrit oxide synthase3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black woman. *Stroke Journal* 10 (5), pp 1848-1853 (2005)
- Joshi, M.S., C., Mineo, P.W., Shaul, J.A., Baurer. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to shear. *The Faseb Journal* 21 (9), pp 2655-2663 (2007)
- Menke, A.P., Muntner, V., Batuman, E.K., Silbergeld, E., Guallar. Blood lead below 0,48 micromol/l (10µg/dl) and mortality among US adults. *Circulation*: 114, pp.1388-1394 (2006).
- Panza, J.A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol*. 20 (suppl.II), pp. II-26-II-33 (1997)
- Riyadina, W.M., Notosuwiryo, A.M., Sirait, L., Tana. Hubungan antara Plumbum (Pb) dalam darah dengan hipertensi pada operator SPBU. *Buletin Penelitian Kesehatan* 30 (2), pp. 82-88 (2002)
- Saruji, D. Pencemaran udara (SO₂, CO, Pb) gas buang kendaraan bermotor di Kota Madya Surabaya. PSL Perguruan Tinggi seluruh Indonesia. *Jurnal Lingkungan dan Pembangunan*, Lembaga Penelitian FE UI, Jakarta (1995).
- Widowati, W., A. Sastiono., R.J. Rumampuk. Efek toksik logam pencegahan dan penanggulangan pencemaran. Penerbit Andi Jogjakarta (2008).